Charakterisierung von „TSH-displacing activity“ (TDA) Verteilung in den IgG-Subklassen

Bengi Akyol

Diss München 1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534901_0042

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München
Direktor: Professor Dr. E. Buchborn

Charakterisierung von "TSH-displacing activity" (TDA): Verteilung in den IgG-Subklassen [+])

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Bengi Akyol
aus Üzümlü/Türkei
1983

[+]) Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 51)

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter...: Prof. Dr. C. R. Pickardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan.....: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 28.2.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Mein Dank gilt

Frau Professor Dr. med. C. R. Pickardt
für die freundliche Überlassung des
Themas und ihre unermüdliche Hilfe.

Herrn Dr. med. A. Witte und
Herrn Dr. med. J. Habermann
für ihre Anregungen und tatkräftige
Unterstützung.

Frau A. Isemann und
Frl. L. Hörterer für die
angenehme Zusammenarbeit.

Frl. F. Haag für die Hilfe bei der
Herstellung der Fotos.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	METHODIK	7
2.1.	Material	7
2.1.1.	Seren	7
2.1.2.	Gele zur Chromatographie	7
2.1.3.	Pufferlösungen	8
2.1.4.	Geräte	9
2.2.	Methoden	9
2.2.1.	Ausfällung von Immunglobulinen	9
2.2.2.	IgG-Präparation durch Ionenaustausch--Chromatographie	10
2.2.2.1.	Prinzip	10
2.2.2.2.	Säulenpräparation	11
2.2.2.3.	Durchführung	12
2.2.2.4.	Einengen der Fraktionen	12
2.2.3.	IgG-Subfraktionierung durch Affinitäts-chromatographie	13
2.2.3.1.	Säulenpräparation	14
2.2.3.2.	Methodische Vorversuche	14
2.2.3.3.	Durchführung	16
2.2.3.4.	Rechromatographien	21
2.2.3.5.	Einengen der Fraktionen	22

		Seite
2.2.4.	Elektrophoresen	24
2.2.5.	Ouchterlony-Tests	25
2.2.6.	Proteinbestimmungen	27
2.2.6.1.	Biuret-Methode	27
2.2.6.2.	Quantitativer nephelometrischer Immunoassay	27
2.2.7.	Radiorezeptorassay	28
2.2.7.1.	Komponenten des Radiorezeptorassays	28
2.2.7.1.1.	Patientenproben	28
2.2.7.1.2.	Schilddrüsenmembranpräparation	29
2.2.7.1.3.	Bovines ^{125}J-TSH	30
2.2.7.1.4.	Standards und Standardkurve	34
2.2.7.2.	Testansatz und Durchführung	34
3.	ERGEBNISSE	36
3.1.	Elektrophoresen	36
3.2.	Ouchterlony-Tests	37
3.3.	Nephelometrische IgG-Subklassen--Bestimmung	38
3.4.	TSH-displacing activity-Bestimmung	39
3.5.	Bestimmung der mikrosomalen und Thyreoglobulinantikörper	41
4.	DISKUSSION	42
5.	ZUSAMMENFASSUNG	45
6.	LITERATURVERZEICHNIS	47

1. EINLEITUNG

Obwohl es über die Entstehung des Morbus Basedow viele Theorien (31, 17, 32) gibt, die jedoch alle heute noch nicht als definitiv gesichert gelten können, muß davon ausgegangen werden, daß die Hyperthyreose vom Typ Morbus Basedow eine genetisch determinierte, durch autoimmunologische Prozesse ausgelöste Erkrankung ist, die zu spontanen Remissionen und Exazerbationen neigt. Bei der Pathogenese dieser Krankheit spielen Autoantikörper, die in 60-80 % der unbehandelten Basedow-Patienten durch Radiorezeptorassays nachgewiesen wurden (25, 31), eine wesentliche Rolle. Es handelt sich dabei wahrscheinlich um Autoantikörper gegen die TSH-Rezeptoren in den Schilddrüsenzellmembranen. Durch Verlaufskontrollen während und nach einer thyreostatischen Behandlung konnten Schleusener und Mitarbeiter (26) eine weitgehende Übereinstimmung zwischen Antikörperaktivität und der Ausheilung oder dem Persistieren der Erkrankung zeigen.

Die thyreotropen Antikörper, zum ersten Mal im Jahre 1956 von Adams und Purves (1) beschrieben, werden in der älteren Nomenklatur als "Long acting thyroid stimulator" (LATS) bezeichnet.

Schilddrüsenstimulierende Antikörper wurden von verschiedenen Gruppen (13, 22) als Immunglobuline der Klasse G (IgG), die ca. 80 % der Immunglobulinfraktion im Serum ausmacht (s. Tab. 1), identifiziert. Diese Antikörper stimulieren die Schilddrüse unabhängig vom Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse. Nach Bindung von Autoimmunglobulinen an die TSH-Rezeptoren der Thyreozytenmembranen wird, wie zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre (22, 26) zeigen, die intrathyreoidale Adenylzyklaseaktivität stimuliert und es kommt zu einer vermehrten Synthese und Freisetzung von Thyroxin und Trijodthyronin (24).

Durch die erhöhte, von der Kontrolle des normalen Regelkreises nicht mehr beeinflußte Schilddrüsenhormonsekretion wird die TSH-Sekretion vom Hypophysenvorderlappen maximal gedrosselt.

Es konnte gezeigt werden, daß neben schilddrüsenstimulierenden zirkulierenden Antikörpern zelluläre immunologische Prozesse eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des Morbus Basedow haben (31).

Bei dem von uns verwendeten Versuchsaufbau zum Nachweis schilddrüsenstimulierender Immunglobuline handelt es sich um einen Radiorezeptorassay. Da bei diesem Nachweisverfahren die Verdrängung von radioaktiv markiertem TSH (s. 2.2.7.1.3.) durch den atypischen Stimulator gemessen wird, wird die nachgewiesene Aktivität als "TSH-displacing activity" (TDA) bezeichnet.

Da die Auftrennung von Immunglobulinen im Mittelpunkt dieser Arbeit steht, sollen hier noch einige grundsätzliche Erläuterungen zu diesen Serumproteinen gemacht werden. Die Immunglobuline sind heterogene Glykoproteine, die aus zwei identischen schweren (H) und zwei identischen leichten (L) Polypeptidketten bestehen, welche durch inter-Ketten-Disulfidbindungen und nicht-kovalente Kräfte miteinander verbunden sind (s. Abb. 1).

Die Moleküle werden in Abhängigkeit von drei Struktureinheiten klassifiziert und benannt:

- Konstante Regionen von H-Ketten, welche die Unterscheidung in Klassen oder Isotypen gestatten und entweder als Gamma-, Alpha-, My-, Delta- oder Epsilon-Kette bezeichnet werden.
- Konstante Regionen leichter Ketten, die den Typ oder Isotyp bestimmen.
- Variable Teile der H- und L-Ketten, d.h. Polypeptidsequenzen, die für die antigenen Determinanten spezifisch sind.

Die H-Ketten des IgG bestehen aus etwa 450 Aminosäuren, während

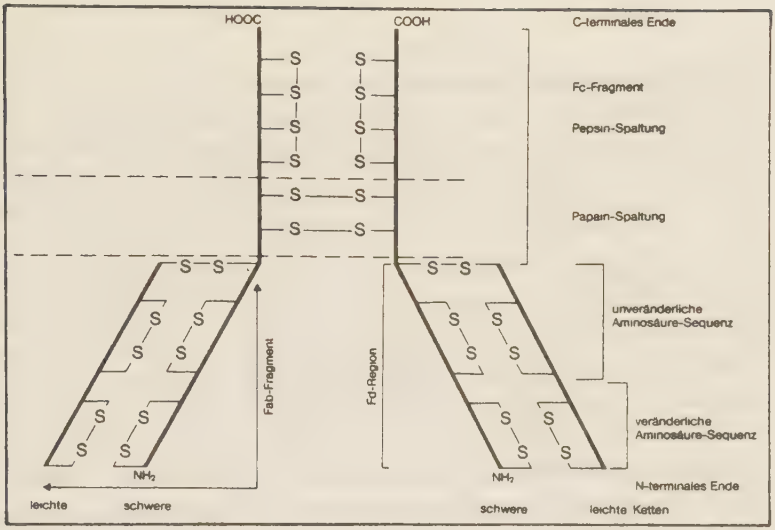

Abb. 1: Schematische Darstellung eines Antikörpermoleküls (aus "Radioimmunoassay in Theorie und Praxis" von Sokolowski/Wood.

die L-Ketten aus ca. 215 Aminosäuren zusammengesetzt sind.

Die leichten (L)-Ketten werden entweder als Kappa- oder Lambda-Typen bezeichnet und zwei identische Ketten des Kappa- oder Lambda-Typs sind in jedem Molekül zu finden, niemals jedoch eine Mischung von beiden Typen.

Das Immunglobulin-Molekül kann in vitro durch die Enzyme Papain und Pepsin in Fragmente gespalten werden (s. Abb. 1). Es sind die F(ab)2-Fragmente, die die Bindungsstellen für die Antigen-Determinanten enthalten. Der Fc-Teil ist an der Komplementbindung beteiligt, und das Fd-Fragment als Teil der H-Kette ist hauptsächlich für die Bestimmung der Antikörperspezifität verantwortlich und trägt einige gut definierte genetische Faktoren. Der biologisch aktive Teil der

schilddrüsenstimulierenden Antikörper wurde von Mehdi und Kriss (19) im Fd-Region der H-Ketten lokalisiert.

Die Immunglobuline können elektrophoretisch von den anderen Serumfraktionen unterschieden werden (s. Abb. 15) und werden in verschiedene Klassen (s. Tab. 1) unterteilt.

Das Immunglobulin G besitzt ein Molekulargewicht von 150000. Die mittlere Konzentration für Erwachsene beträgt im Humanserum in Abhängigkeit von der Methode 994 mg/dl. IgG macht knapp 80 % der gesamten Serumimmunglobuline aus. Einige Subklassen, von denen IgG vier besitzt (s. Abb. 2), sind zur Komplementbindung fähig (IgG 1, IgG 3 und IgG 4). Die Makrophagen haben Oberflächenrezeptoren für den Fc-Teil von IgG 1 und IgG 2, und ermöglichen dadurch die Aktivierung derselben für Überempfindlichkeitsreaktionen des Sofort-Typs.

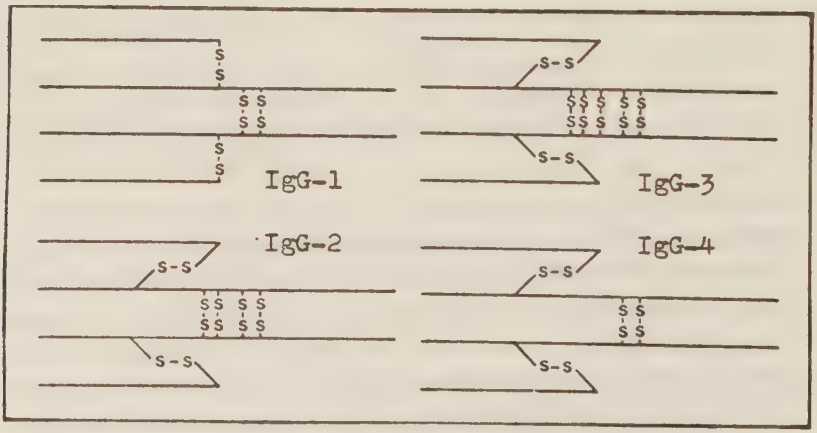

Abb. 2: Topologische Modelle des humanen IgG's (aus "Die Immunglobuline IgG, IgA, IgM" von C. R. Jollif)

IgG ist die einzige Immunglobulinklasse, die in der Lage ist, die maternale Plazentaschranke zu passieren, und tritt deshalb im Serum von Neugeborenen auf, wenn auch mit begrenzter Antikörperaktivität. IgG ist jedoch das Immunglobulin, das nach antigener Stimulation zuletzt gebildet wird.

Das Immunglobulin A (IgA) hat ein Molekulargewicht von 160000 und kann sowohl als Monomeres, wie es normalerweise im Blutkreislauf der Fall ist, wie als Dimeres in Sekretionsflüssigkeiten auftreten. Das Dimere besteht aus zwei IgA-Monomeren, die durch eine von den Epithelialzellen gebildeten J-Kette an einen sog. "secretory piece" gebunden sind.

Das größte normalerweise im Serum vorkommende Immunglobulin ist IgM, das aus fünf kreisförmig angeordneten IgM-Monomeren besteht, die durch eine J-Kette verbunden sind. Sein Molekulargewicht ist auf ca. 900 000 ermittelt worden (s. Tab. 1). IgM ist das erste Immunglobulin, das als Folge einer Immunisierung oder eines antigenen Reizes auftritt und das zuerst vom Neugeborenen gebildet wird. Aufgrund seiner einheitlichen Pentamer--Struktur und seiner Fähigkeit zur Komplementbindung ist dieses Immunglobulin an den Überempfindlichkeitsreaktionen des Sofort--Typs beteiligt.

Die genaue Charakterisierung der schilddrüsenstimulierenden Immunglobuline der Gruppe G ist bisher nur unvollständig gelungen. Das Ziel dieser Arbeit war daher, diese Immunglobuline genauer zu charakterisieren und insbesondere der Frage nachzugehen, ob es sich dabei um mono- oder polyklonale Antikörper handelt. Zu diesem Zweck haben wir Seren von Morbus Basedow--Patienten näher untersucht und dabei auch die Verteilung von TDA in den IgG-Subklassen mit Hilfe eines Radiorezeptorassays bestimmt.

Tab. 1: Einteilung der Immunglobuline (aus "Radioimmunoassay in Theorie und Praxis" von Sokolowski/Wood). Die Klassifizierung entspricht den WHO-Vorschlägen von 1968. Die Sedimentationskonstante der meisten Proteine liegt zwischen 1 und 100 x 10^{-13} sec.. Der Faktor 1 x 10^{-13} wird als eine Svedberg-Einheit (S) bezeichnet.

Klasse	Molekulargewicht	Sedimentationskonstante	Serumkonzentration in g/l	Anteil am Gesamtglobulingehalt in %
IgG	150 000	7 S	3-16	ca. 80
IgM	900 000	19 S	0.5-2	6
IgA	160 000	7 S, 9 S	1.5-4	13
IgD	185 000	7 S	0-0.4	1
IgE	200 000	8 S	< 0.1	0.002

2. METHODIK

2.1. Material

2.1.1. Seren

Es wurden 9 Seren von Patienten mit immunogener Hyperthyreose vom Typ des Morbus Basedow untersucht. Bei der Bestimmung von TDA zeigten 5 der 9 untersuchten Patienten positive und einer eindeutig negative Ergebnisse. Die übrigen drei waren grenzwertig, d.h. sie zeigten weder eindeutig positive noch negative Ergebnisse. Zur Kontrolle (TDA-negatives Serum) wurde Plasma von einem Patienten mit Autonomem Adenom der Schilddrüse, der wegen lebensbedrohlicher Thyreotoxikose einer Plasmaphorese unterzogen wurde, verwendet. Von unserer Arbeitsgruppe wurden ca. 100 Seren von Patienten mit Autonomem Adenom der Schilddrüse untersucht, wobei in keinem Fall TDA nachgewiesen wurde.

Alle Seren wurden nach Lagerung bei -25^{o} C aufgetaut und mit einigen Ausnahmen aus mehreren Blutentnahmen auf die benötigte Menge von 14 ml Serum pro Patient gepoolt.

2.1.2. Gele zur Chromatographie

Als Anionaustauschgel wurde DE-32-Cellulose (Diäthylaminoäthyl--Cellulose) von der Firma Whatman, England, und für die Affinitätschromatographien Protein A-Sepharose CL-4B von der Firma Pharmacia, Schweden, verwendet.

2.1.3. Pufferlösungen

Die Pufferlösungen wurden in der benötigten Molarität hergestellt und unter Kontrolle eines pH-Meters auf den gewünschten pH-Wert gebracht.

Für die Immunglobulinausfällung mit 25%-igem PEG (Polyäthylenglykol 6000, Fa. Merck, Darmstadt) wurde Tris-HCl-Puffer (0.05 M, pH 8.0) verwendet.

Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurden folgende Pufferlösungen hergestellt:

- Puffer A (Tris-HCl-Puffer, 0.05 M, pH 8.0)
- Puffer B (Tris-HCl-Puffer, 1 M, pH 8.0)
- Puffer C (NaCl, 2 M, in Tris-HCl-Puffer, 0.05 M, pH 8.0)

Für die Affinitätschromatographien wurden Mc Ilvaine's (18) Citrat/Phosphat-Pufferlösungen mit pH 7.0, pH 5.0 und pH 3.0 aus Citronensäure (0.1 M, pH 2.2) und sekundärem Natriumphosphat (0.2 M) hergestellt. Zu sek. Natriumphosphat (0.2 M) wurde soviel Citronensäure (0.1 M, pH 2.2) hinzugegeben, bis der gewünschte pH-Wert erreicht wurde.

Zum Vorlegen in die Sammelröhrchen wurde 0.4 M Natriumphosphat hergestellt.

Allen Pufferlösungen wurde als Bakteriostatikum 0.02 g/dl Natrium-Azid zugesetzt.

Alle Reagenzien waren von der Firma Merck, Darmstadt.

2.1.4. Geräte

- Peristaltikpumpe "Micro Pump" MP 13 (Ismatec, Schweiz)
- pH-Meter "pH DIGI 510" (WTW, Weilheim)
- Fallbügelschreiber "Chopper Bar Recorder 6520"
- UV-Monitor "Uvicord S 2138"
- Fraktionssammler "Ultro Rac II 2070"
- Gradientenmischer "LKB 8122" (s. Abb. 4)

Alle nicht näher bezeichneten Geräte sind von LKB, Schweden.

2.2. Methoden

2.2.1. Ausfällung von Immunglobulinen

Die Immunglobuline im Serum wurden mit PEG ausgefällt (33, 2). Bei dieser Trennung wurde eine 25%-ige (w/v) PEG-Lösung (in Puffer A) verwendet.

2 ml Serum wurde zuerst durch ein 5 ml-Einmalspritzenzylinder (Fa. Braun, Melsungen), der unten mit einer Plastik-Fritte und einem Filterpapier (beide von Fa. Sartorius, Göttingen) verschlossen war, filtriert und über Siebe mit Porendurchmesser von 45 µm und anschließend 22 µm ("Schwarzrand"- bzw. "Weißrand"-Siebe von Fa. Schleicher & Co., Dassel), die an Einmalspritzen angeschlossen waren, gesiebt. Dadurch wurden im Serum Proteinmoleküle mit einem Durchmesser von kleiner als 22 µm getrennt, d.h. Proteine mit einem Molekulargewicht von ca.7 Mill. und kleiner wurden durch das Sieb gepresst. Darin sind alle Immunglobuline, deren größter Vertreter bekanntlich IgM mit einem Molekulargewicht von 900 000 ist (s. Tab. 1), enthalten.

Vorheriges Entfetten mit reinem Frigen (Fa. Serva, Heidelberg) hatte keine wesentlichen Vorteile gebracht, deshalb haben wir davon abgesehen.

Danach wurde zu je 1 ml Serum in zwei Eppendorfgefäßen mit Verschlußkappen (Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg) je 1 ml 25 %-ige (w/v) PEG-Lösung (in Puffer A, s. 2.1.3.) hinzupipettiert. Nach kurzem Aufschütteln des Gemisches wurde 3 Minuten bei 8000 g (Eppendorf-Zentrifuge 5411) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in den Reaktionsgefäßen mit einer an eine Wasserstrahl-Pumpe angeschlossenen Pasteur-Pipette scharf abgesaugt und das Pellet in 0.5 ml Puffer A mit Kunststoffrührspateln resuspendiert. Die resuspendierten Pellets wurden dann erneut mit 1 ml 25 %-iger PEG-Lösung (in Puffer A) gefällt. Nach Aufschütteln wird das Gemisch wiederum 3 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wird das Pellet zur Weiterverarbeitung in 1 ml Puffer A resuspendiert. Eine gegebene Serummenge wurde so auf die Hälfte des Ausgangvolumens gebracht.

2.2.2. IgG-Präparation durch Ionenaustausch-Chromatographie

Nach Ausfällung von Immunglobulinen im Serum mit PEG wurde IgG durch Anionenaustausch-Chromatographie angereichert.

2.2.2.1. Prinzip

Ionenaustauscher sind Kunstharze mit sauren (Kationenaustauscher) oder basischen (Anionenaustauscher) funktionellen Gruppen, die die daran angelagerten Kationen bzw. Anionen in wäßriger Lösung leicht gegen andere entsprechend geladene Moleküle austauschen. Für die Chromatographie wurde von uns ein Anionenaustauscher verwendet.

Die basischen Gruppen können je ein Elektron abdissozieren. Es bleibt aber aus Gründen der Elektroneutralität in der Nähe und kann sich nur entfernen, wenn ein anderes negatives Ion an seine

Stelle tritt. Zum Beispiel wird Cl^- von der Lösung an das Harz locker gebunden und im Austausch OH^- in die Lösung abgegeben, bis Gleichgewichtsbedingungen erreicht sind. Die Stärke der Bindung an das Harz hängt von den Dissoziationskonstanten der einzelnen Gruppen und vom pH des Elutionsmittels ab, was für die Trennung von Proteinen von Bedeutung ist.

2.2.2.2. Säulenpräparation

Als Ionenaustauscher wurde DE 32 - Cellulose verwendet. Das Gel DE 32 - Cellulose wurde folgendermaßen vorbereitet bzw. regeneriert:

50 g Geltrockensubstanz bzw. gebrauchte DE 32 - Cellulose wurde mindestens 30 Minuten, aber nicht länger als 2 Stunden, in 1 Liter HCl (0.5 M) mit Hilfe eines Rührers gequollen. Nach Absaugen des Überstandes mit einer an eine Wasserstrahl-Pumpe angeschlossenen Pipette oder Sieben mit einer Fritte wurde ca. 0.5 Liter Aqua dest. hinzugefügt. Das Gel wurde anschließend mit Hilfe einer Wasserstrahl-Pumpe entgast. Danach wurde mit Aqua dest. über eine Fritte gewaschen, bis pH 4.0 erreicht wurde. Nun wurde die Substanz in 1 Liter NaOH (0.5 M) 30 Minuten gequollen und nach Absaugen des Überstandes mit Aqua dest. durch eine Fritte gewaschen, bis pH 8.0 erreicht wurde. Zum Schluß wurde mit Puffer A einige Male über Fritte gewaschen und die Cellulose zum späteren Gebrauch in ein Gefäß mit Überschuß an Puffer A im Kühlraum bei 4° C aufbewahrt.

Nach Aufschütteln wurde die so präparierte DE 32 - Cellulose-Suspension in 5 ml-Einmalspritzenzylinder, vor deren Auslauf feinporige Plastik-Fritten gelegt wurden, bei verschlosse-

nem Auslauf mit Pipetten gefüllt. Nach der Sedimentation des Gels wurde an die Oberfläche ein Filterpapier gelegt, um das Gelbett zu stabilisieren.

2.2.2.3. Durchführung

Es wurde bei Zimmertemperatur chromatographiert, wobei Fraktionen zu je 25 Tropfen bei einer Flußrate von 14 ml/h gesammelt wurden.

Die präparierte DE 32-Cellulose-Säule wurde mit ca. 5 ml Puffer A (s. 2.1.3.) vorgespült und anschließend wurde die Probe (in 1 ml Puffer A) aufgetragen. Mit einer Peristaltikpumpe wurde dann Puffer A auf die Säule gepumpt.

Der Proteinpeak A wurde mit ca. 6 ml Puffer A und Peak B mit ca. 4 ml Puffer B vollständig eluiert (s. Abb. 3), bis jeweils im UV-Monitor die Null-Linie erreicht war. Anschließend wurde das Gel mit Puffer C gewaschen. Das gebrauchte Gel wurde zur späteren Regenerierung (s. 2.2.2.2.) in einem Gefäß mit Überschuß an Puffer A im Kühlraum bei 4° C aufbewahrt.

2.2.2.4. Einengen der Fraktionen

Zum Einengen von Peak A und B (s. Abb. 3) wurden Kollodiumhülsen (Fa. Sartorius, Göttingen) verwendet.

Die gesammelten Fraktionen von Peak A bzw. B wurden gepoolt und in die vorbereiteten Kollodiumhülsen pipettiert. Die Kollodiumhülse befindet sich in einem Gefäß, das mit 0.9 %-igem NaCl gefüllt ist und an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wird. Die Eluate wurden auf ca. 1 ml eingeengt und zur weiteren Auftrennung mit Protein A-Sepharose am folgenden Tag in Eppendorf-Reaktionsgefäßen im Kühlraum bei 4° C aufbewahrt.

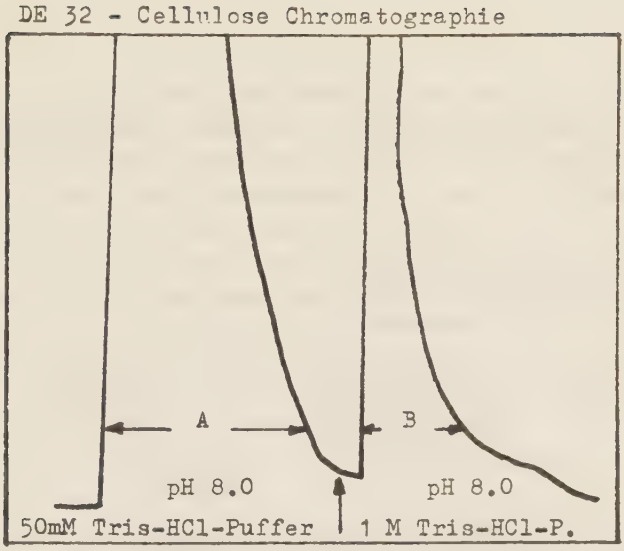

Abb. 3: Elutionsprofil der Ionenaustauscher-Chromatographie mit DE 32-Cellulose
Puffer A: Tris-HCl-Puffer (0.05 M, pH 8.0)
Puffer B: Tris-HCl-Puffer (1 M, pH 8.0)

2.2.3. IgG-Subfraktionierung durch Affinitätschromatographie

Zur Subfraktionierung von IgG wurden Affinitätschromatographien mit Protein A-Sepharose CL-4B durchgeführt.

Protein A-Sepharose besteht aus Sepharose CL-4B, an die Protein A mit Bromcyan kovalent gebunden und mit Dextran und Laktose gefriergetrocknet worden ist. 1 g davon entsprechen ca. 3.5 ml gequollenem Gel, worin ca. 7 mg reines Protein A enthalten ist. Die Bindungskapazität für Human-IgG beträgt ca. 25 mg IgG/ml Gel.

Protein A wird aus der Zellwand der Staphylococcus aureus isoliert (30, 20) und besitzt eine der Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes ähnliche Wechselwirkung zu IgG--Subklassen 1, 2 und 4, abhängig vom pH-Wert des Elutionsmittels. Ein Molekül Protein A kann zwei Moleküle IgG binden (27, 11) und mit den IgG-Subklassen 1, 2 und 4 Präzipitate bilden (14). Die Eigenschaft des Protein A, IgG-Subklassen 1, 2 und 4 spezifisch zu binden, macht die Affinitätschromatographie mit Protein A-Sepharose CL-4B zur Methode der Wahl für die Isolierung von IgG-Subklassen.

2.2.3.1. Säulenpräparation

Protein A-Sepharose CL-4B (1.5 g Pulver) wurde in Natriumphophat-Puffer (0.2 M, pH 8.0) über Nacht gequollen und in eine 5 ml-Einmalspritzenzylinder, vor deren Auslauf eine Plastik-Fritte gelegt wurde, bei verschlossenem Auslauf gefüllt. Nach der Sedimentation wurde die Oberfläche des Gels mit einer weiteren Plastik-Fritte luftblasenfrei stabilisiert (s. Abb. 4).

Bei ständigem Feuchthalten des Gels waren die präparierten Säulen im Kühlraum bei 4^{o} C wochenlang haltbar.

Vor dem Gebrauch wurden die Säulen mit Mc Ilvaine`s Citrat/ /Phosphat-Puffer pH 7.0 vorgespült.

2.2.3.2. Methodische Vorversuche

Um festzustellen, welche Immunglobulin G-Mengen mit einer 5 ml Protein A-Sepharose CL-4B - Säule am besten subfraktioniert werden, haben wir IgG von 1, 2 und 4 ml Serum über

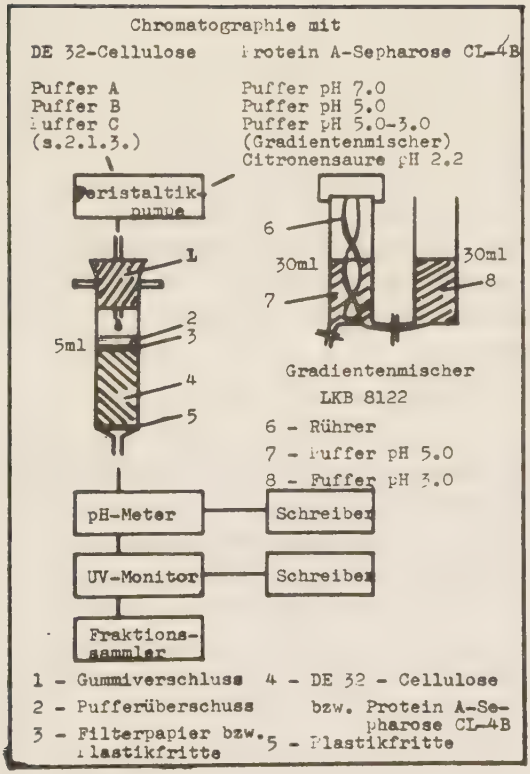
Chromatographie mit
DE 32-Cellulose
Protein A-Sepharose CL-4B
Puffer A
Puffer B
Puffer C
(s.2.1.3.)
Puffer pH 7.0
Puffer pH 5.0
Puffer pH 5.0-3.0
(Gradientenmischer)
Citronensaure pH 2.2
Peristaltik-pumpe
1
2
3
4
5
5ml
6
7
30ml
30ml
8
Gradientenmischer
LKB 8122
6 - Rührer
7 - Puffer pH 5.0
8 - Puffer pH 3.0
pH-Meter
Schreiber
UV-Monitor
Schreiber
Fraktions-sammler
1 - Gummiverschluss
2 - Pufferüberschuss
3 - Filterpapier bzw. Plastikfritte
4 - DE 32 - Cellulose bzw. Protein A-Sepharose CL-4B
5 - Plastikfritte

Abb. 4:

je eine 5 ml-Säule chromatographiert. Die Trennungen sind in den Abbildungen 5, 6 und 7 zu sehen.

Wir entschieden uns für die Auftrennung von 2 ml Serum, weil diese Menge relativ gut subfraktioniert wurde und die eindeutigste Trennung der einzelnen Proteinpeaks zeigte.

2.2.3.3. Durchführung

Alle Chromatographien wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Es wurden bei einer Flußrate von 14 ml/h Fraktionen zu je 25 Tropfen gesammelt.

Nach Vorspülen der Säule mit ca. 5 ml Puffer pH 7.0 wurde mit einer Eppendorf-Pipette die Probe (s. 2.2.2.4.) aufgetragen und, sobald sie in das Gel eingesunken war, etwas Überschuß vom selben Puffer nachpipettiert und die Chromatographie gestartet.

Chromatographie von Peak A (s. Abb. 8):

Nach Elution des Peak I (Puffer pH 7.0) wurde die Säule mit Puffer pH 5.0 äquilibriert, bis der pH-Wert (pH-Meter mit Durchflußelektrode) auf 5.0 gesunken war. Danach wurde der inzwischen aufgebaute und mit den entsprechenden Puffern gefüllte Gradientenmischer (s. 2.1.4. und Abb. 4) angeschlossen, um eine kontinuierliche Abnahme des pH-Wertes des Elutionspuffers von pH 5.0 auf 3.0 zu erreichen. In die Zylinder des Gradientenmischers wurden für die Chromatographie pro Säule folgende Mengen Puffer gefüllt:

30 ml Puffer pH 5.0 in den Zylinder mit dem Rührer,
30 ml Puffer pH 3.0 in den Zylinder ohne Rührer (s. Abb. 4).

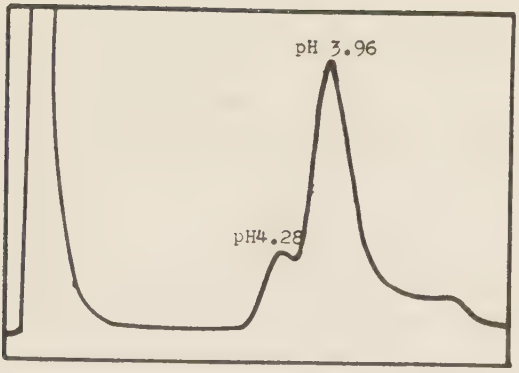

Abb. 5: Chromatographie von IgG aus 1 ml Serum über 5 ml Protein A-Sepharose-Säule

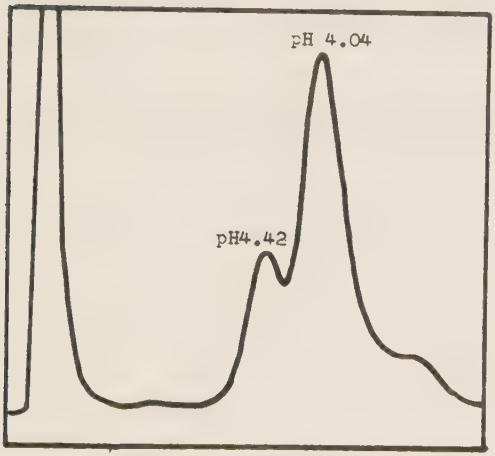

Abb. 6: Chromatographie von IgG aus 2 ml Serum über 5 ml Protein A-Sepharose-Säule

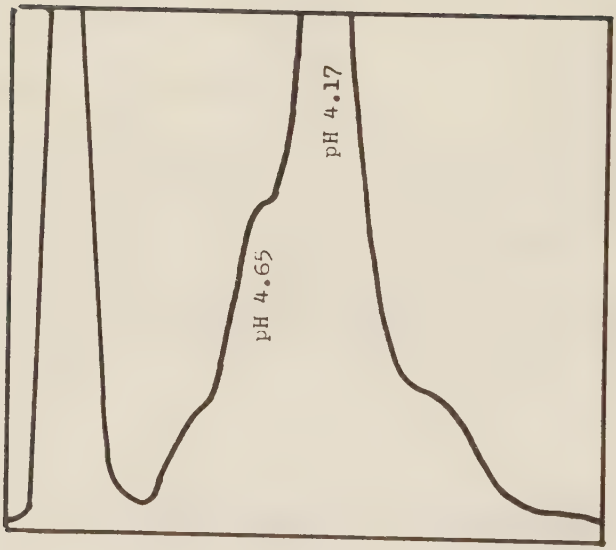

Abb. 7: Chromatographie von IgG aus 4 ml Serum über 5 ml Protein A-Sepharose-Säule

Für die folgenden Peaks, ca. ab Fraktion 15, wurden 0.5 ml sek. Natriumphosphat (0.4 M) je Sammelröhrchen vorgelegt, um die niedrigeren pH-Werte des Eluats zu neutralisieren und damit ein Denaturieren der Proteine zu verhindern.

Peak II wurde zwischen pH 4.6 und 4.2, Peak III zwischen pH 4.2 und 3.8 eluiert. Der Abstand zwischen Peak II und III betrug in jedem Fall 0.4 pH-Einheiten (s. Abb. 8).

Bei welchem pH-Wert das Maximum des Peaks II bzw. III eluiert wurde, war bei den verschiedenen Durchgängen von der Menge der Probe abhängig und variierte um etwa 0.2 pH-Einheiten. Nach Elution des Peak III wurde die Säule mit ca. 10-15 ml Citronensäure (0.1 M, pH 2.2) gewaschen und anschließend mit dem Puffer pH 7.0 nachgespült, bis pH 7.0 erreicht wurde.

Chromatographie von Peak B (s. Abb. 9):

Unter denselben Bedingungen wurde auch Peak B der DE 32-Chromatographie über die Protein A-Sepharose-Säule chromatographiert. Peak IV erscheint im Ausschlußvolumen, und zwischen pH 4.8 und 3.8 erscheinen weitere zwei Peaks, die wir wegen der zu geringen Proteinmenge zusammen als Peak V (s. Abb. 9) bezeichnet haben.

Die niedrigeren pH-Werte des Eluats bei Peak V wurden ebenfalls mit 0.4 M sek. Natriumphosphat neutralisiert. Auch hier wurde anschließend mit 10-15 ml Citronensäure (0.1 M, pH 2.2) gewaschen und danach mit dem Puffer pH 7.0 nachgespült.

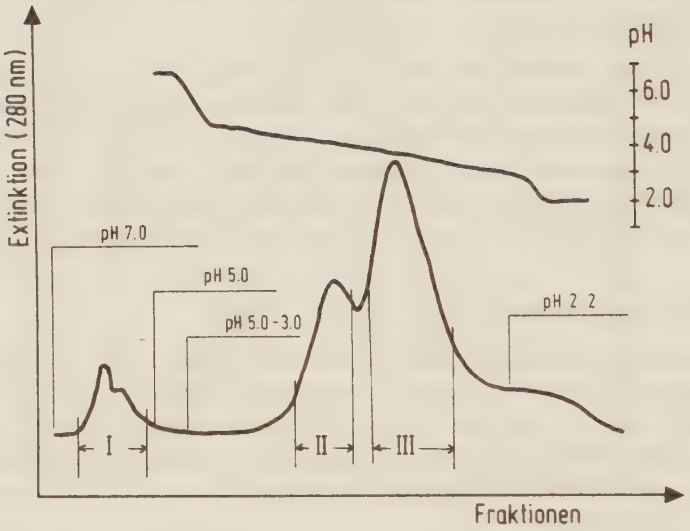

Abb. 8: Chromatographie von Peak A mit Protein A - - Sepharose (s. Abb. 3).
Eluiert wurde mit Mc Ilvaine's Citrat/Phosphat--Puffer pH 7.0, pH 5.0, pH 5.0-3.0 (Gradientenmischer) und Citronensäure, 0.1 M, pH 2.2. Die Fraktionen (25 Tropfen) wurden in der Ausdehnung der Pfeile gepoolt und in Kollodiumhülsen eingeengt.

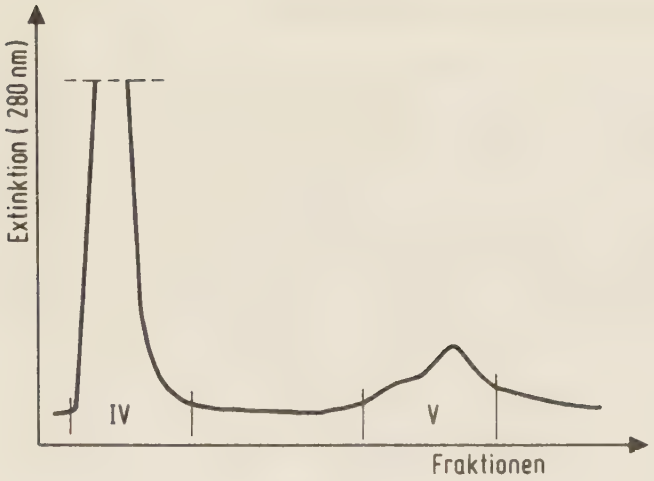

Abb. 9: Chromatographie von Peak B (s. Abb. 3) mit Protein A-Sepharose. Gleiche Bedingungen wie in Abb. 8.

2.2.3.4. Rechromatographien

Durch regelmäßiges Durchführen von Rechromatographien der einzelnen Peaks unter denselben Bedingungen wie bei der ursprünglichen Auftrennung wurde die Qualität der Trennungen überprüft (s. Abb. 10 und 11). Dies war besonders für Peak II und III (s. Abb. 11) von Bedeutung, da hier eine deutliche Überlappung vorlag.

2.2.3.5. Einengen der Fraktionen

Peak I, II, III (s. Abb. 8) und Peak V (s. Abb. 9) wurden in Kollodiumhülsen (s. 2.2.2.4.) zuerst auf ca. 1 ml, und nach anschließendem Auffüllen mit 0.9 %-iger NaCl-Lösung auf ca. 0.5 ml eingeengt. Die Kollodiumhülsen mit den eingeengten Proben wurden im Konzentriergefäß, nach vorherigem Austauschen der gebrauchten NaCl-Lösung im Gefäß gegen frische 0.9 %-ige NaCl-Lösung, über Nacht im Kühlraum bei 4° C stehengelassen. Die einzelnen Proben standen schließlich in folgenden Mengen zur Verfügung:

Peak I, II und V je ca. 0.5 ml, Peak III ca. 1 ml.

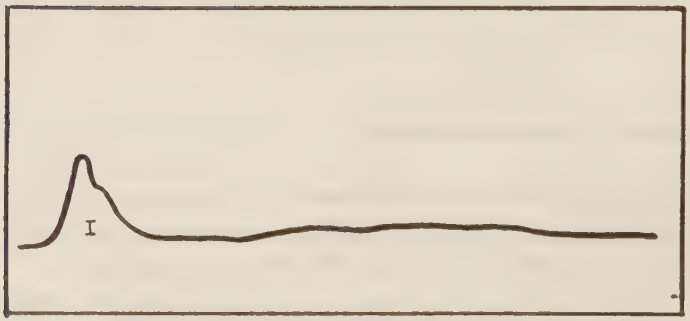

Abb. 10: Rechromatographie von Peak I (s. Abb. 8) mit Protein A-Sepharose. Gleiche Bedingungen wie in Abb. 8.

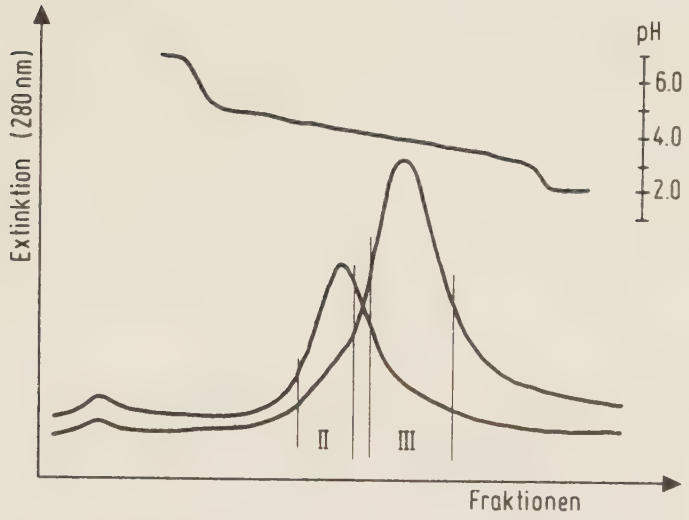

Abb. 11: Rechromatographie von Peak II und III (s. Abb. 8) mit Protein A-Sepharose. Gleiche Bedingungen wie in Abb. 8.

2.2.4. Elektrophoresen

Zum qualitativen Nachweis von IgG wurden Elektrophoresen mit Celluloseacetat durchgeführt (s. 3.1. und Abb. 15). Als Elektrophorese-Puffer fand Phosphat-Puffer (pH 9.0) Verwendung. Die Laufzeit betrug eine Stunde bei 200 V, 8 mA und konstanter Stromstärke (Netzteil "pherostat" v. Fa. Boskamp).

Acetatfolien waren waren von der Fa. Sartorius, Göttingen. Multiphoresekammer von der Fa. Boskamp, Auftragsstempel und Glasscheiben von der Fa. Vogel, Lahn.

Zur Färbung des Celluloseacetats wurde Ponceau S - rot der Fa. Sartorius, Göttingen, verwendet, Färbezeit zehn Minuten.

Nach dem Entfärben in einer Entfärbelösung (Fa. Sartorius, Göttingen) aus Methanol und Essigsäure wurde die Acetatfolie auf eine Glasplatte gelegt, mit einem Roller angedrückt und schließlich für einige Minuten in eine Transparenzlösung (Fa. Vogel, Lahn) aus Dioxan-Isobutanol gebracht. Danach wurde sie aus der Lösung herausgenommen und in einem Trockenschrank 10 Minuten bei 105° C getrocknet.

2.2.5. Ouchterlony-Tests

Zum qualitativen Nachweis von IgG-Subklassen, IgM und IgA wurden Ouchterlony-Tests mit dem Serum und den präparierten IgG-Subfraktionen (Peak I-V) durchgeführt (s. 3.2. und Tab. 2).

Das Gel wurde folgendermaßen angesetzt:

0.1 g Agarose A (Fa. Pharmacia, Schweden) wurde zusammen mit 10 ml Natriumphosphat-Puffer (0.05 M, pH 7.4, steril), 0.09 g NaCl und 0.4 g Polyäthylenglykol 6000 (Fa. Merck, Darmstadt) gekocht, bis die Lösung vom trüben in den klaren Zustand überging. Das heiße Gel wurde vorsichtig auf die hydrophile Seite der auf einem waagrecht nivellierten Horizontaltisch liegenden Plastikplatte gegossen, so daß es die gesamte Oberfläche der Plastikplatte bedeckt. Mit Hilfe einer geeigneten Schablone und eines Gelplattenhalters wurden dann nach Erstarren des Gels Löcher (Außendurchmesser 2.5 mm) in Rosettenform in die Gelschicht der Plastikplatte ausgestanzt (Fa. LKB, Schweden).

Zum Auftragen der Proben wurden Capillettor-Pipetten (Fa. Labora, Mannheim) oder SMI-Pipetten (Fa. SMI, Kanada) benutzt. In die Zentrallöcher wurden spezifische Kaninchen-Antikörper gegen Human-IgG-Subklassen 1-4, Human-IgM oder Human-IgA (sämtlich von Fa. Behring, Marburg), in die peripheren Stanzlöcher Proben von Peak I-V und Serum (unverdünnt) pipettiert. Nach Einbringen der Proben wurde die Immunplatte über Nacht in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Proben diffundierten kreisförmig in die Gelschicht. Zwischen Antigenen (Proben) in den peripheren Stanzlöchern und den korrespondierenden Antikörpern im Zentralloch bildeten sich Antigen-Antikörper-Komplexe, die als Präzipitate zu erkennen waren.

Die Immunplatte wurde mit einem feuchten Filterpapier (Fa. Whatman, Ferrieres, Frankreich) luftblasenfrei bedeckt und darüber noch einige trockene Filterpapiere und Zellstoff gelegt. Nach ca. 15 Minuten wurde die Bedeckung vorsichtig abgehoben. Anschließend wurde die Platte zweimal 15 Minuten in 0.9 %-igem NaCl und 15 Minuten in Aqua dest. gewaschen. Danach wurde wieder mit Filterpapier und Zellstoff getrocknet. Schließlich wurde die Oberfläche der Immunplatte mit einem Fön solange getrocknet, bis sie glänzte.

Die Immunplatten wurden ca. 30 Minuten gefärbt.

Die Färbelösung bestand aus 5 g Amidoschwarz, 450 ml 96 %-igem Äthanol, 100 ml Essigsäure und 450 ml Aqua dest..

Zum Entfärben wurde folgende Lösung verwendet:

450 ml 96 %-iges Äthanol, 100 ml Essigsäure und 450 ml Aqua dest..

Nach der Entfärbung (30 Minuten) wurde die Immunplatte an der Luft getrocknet.

2.2.6. Proteinbestimmungen

2.2.6.1. Biuret-Methode

Die Proteinbestimmung der einzelnen Proben wurde mit der Biuret-Methode durchgeführt.

Prinzip:
Proteine und Peptide geben im Gegensatz zu anderen stickstoffhaltigen Verbindungen (z.B. Creatinin, Harnstoff und Harnsäure) in alkalischer Lösung mit Kupferionen einen violetten Farbkomplex.

Bei der Proteinbestimmung fand das Filterphotometer Abbott-VP (Filter: 550/650 nm) von der Fa. Abbott, USA, Verwendung. Es wurden für die Messung 200 µl je Probe bzw. Vergleichswert benötigt. Als Vergleichswerte wurden Aqua dest., niedriger Standard (1 mg/ml), hoher Standard (2 mg/ml), Kontrollserum 1:2 und Kontrollserum 1:4 mitbestimmt.

2.2.6.2. Quantitativer nephelometrischer Immunoassay

Die Bestimmung der IgG-Subklassen in den Subfraktionen I, II, III und V wurde freundlicherweise vom Paul-Ehrlich-Institut in Frankfurt a. M. durch Anwendung einer quantitativ nephelometrischen Immunoassay-Methode durchgeführt (s. Tab. 3).
Diese Immunoassay-Methode wurde 1980 von O. E. Beck und P. E. Kaiser (3) zur Bestimmung von IgG-Subklassen-Konzentrationen in Menschenseren entwickelt, wobei Beckman Immunochemistry Analyzer, subklassen-spezifische Antiseren und humanes Serumstandard H00-02 verwendet wurden.

2.2.7. Radiorezeptorassay

Der Radiorezeptorassay (RRA) ist im Prinzip wie der Radioimmunoassay (RIA) aufgebaut, nur anstelle des Antikörpers beim RIA wird beim RRA ein membrangebundener Rezeptor - bei unseren Versuchen TSH-Rezeptoren aus Schilddrüsenmembranpräparationen - als Bindungsprotein eingesetzt.

Der RRA wurde von uns zur Bestimmung von TDA in Patientenproben aufgebaut und durchgeführt. Dabei wird die Verdrängung von radioaktiv markiertem TSH aus der Bindung an eine Schilddrüsenmembranpräparation durch IgG aus Patientenseren ermittelt.

TDA wurde als Quotient der TSH-Bindung in Gegenwart des Probanden-IgG durch die TSH-Bindung nach Zugabe von Kontroll-IgG in % angegeben, wobei Werte unter 85 % als positiv angesehen wurden.

$$TDA = \frac{\text{TSH-Bindung nach Zugabe des Probanden-IgG}}{\text{TSH-Bindung nach Zugabe von Kontroll-IgG}} \ \%$$

2.2.7.1. Komponenten des Radiorezeptorassays

2.2.7.1.1. Patientenproben

Die Proben Peak A (Gesamt-IgG, s. Abb. 3), Peak I, II, III und V (s. Abb. 8 und 9) wurden, je nach der mit der Biuret-Methode bestimmten Gesamtproteinmenge, mit 0.9 %-igem NaCl auf 20, 10 oder 5 mg/ml verdünnt.

2.2.7.1.2. Schilddrüsenmembranpräparation

Menschliches Schilddrüsengewebe aus Operationsmaterial wurde mit dem Staedy-Riggs-Mikrotom in dünne Scheiben geschnitten. Anschließend wurden die Gewebeschnitte in ein Becherglas mit Tris-HCl-Puffer (0.01 M, pH 7.4) gegeben (für 1 g Schilddrüsengewebe ca. 5 ml Puffer). Das Becherglas mit dem Puffer wurde vor und nach der Zugabe von Schilddrüsengewebe gewogen und die Differenz als X g SD-Äquivalent (Schilddrüsen-Äquivalent) festgelegt. Die Schilddrüsenschnitte wurden dann mit einer Schere kleingeschnitten und in Glasröhrchen mit je 5 ml Suspension homogenisiert (Polytron, Stufe 4, 10 sek.). Das Homogenat wurde durch vier Schichten Mull filtriert und in 22 ml-Polyröhrchen gefüllt. Danach wurde 10 Minuten bei 500 g (Hettich-Zentrifuge) zentrifugiert (Entfernung der Zellkernfraktion im Pellet) und der Überstand in 30 ml-Beckman-Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt. Nach 20-minutigem Zentrifugieren (Beckman) bei 15 000 g wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit Pasteur-Pipetten in 0.5 ml Puffer (s. oben) resuspendiert. Dieser Vorgang wurde anschließend zweimal wiederholt und schließlich das Pellet in X ml Tris-HCl-Puffer (0.01 M, pH 7.4) resuspendiert (3 g SD-Äquivalent entspricht 1 ml Membransuspension).

2.2.7.1.3. Bovines ^{125}J-TSH

Bei unseren Untersuchungen wurde radioaktiv markiertes bovines TSH als Tracer und ^{125}J mit einer Halbwertzeit von 60 Tagen als Isotop verwendet.

Zur ^{125}J-Markierung des bovinen TSH wurde die Chloramin T-Methode (6, 12) gewählt.

Im Prinzip werden ein oder zwei Jod-Atome in einen Tyrosin- bzw. Histidinrest der zu markierenden Substanz eingeführt.

Zu 5 µl hochgereinigtem bovinen TSH-Standard (2.5 µg), der uns von Dr. Pierce freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, werden 30 µl ^{125}J (1 mCi) und 10 µl Chloramin T (25 mg Chloramin T gelöst in 8 ml Phosphatpuffer, 0.1 M, pH 7.4) hinzupipettiert und 3-5 sek. geschüttelt.

Durch Zugabe von 20 µl Natriummetabisulfit-Lösung (25 mg Natriummetabisulfit gelöst in 8 ml Phosphatpuffer, 0.1 M, pH 7.4) wird die Oxydation des Jodids gestoppt.

Nach der Markierung liegen in der Reaktionslösung neben markierten auch unmarkierte, oxydierte Substanzen, radioaktives Jodid, Molekülbruchstücke, Chloramin T und das Reduktionsmittel Natriummetabisulfit vor. Um eine gute Qualität des Tracers zu erreichen, ist es daher unerläßlich, sofort nach der Markierung eine Reinigung des Reaktionsgemisches und eine Abtrennung der verschiedenen Substanzen durchzuführen. Für die Reinigung des markierten bovinen TSH-Tracers haben wir Molekularsiebchromatographien mit Sephadex G 75 (Fa. Pharmacia, Schweden) durchgeführt (Elutionspuffer: Phosphatpuffer, 0.02 M, pH 7.4, und 0.2 %-iges bov. Serumalbumin). Es wurden 1 ml-Fraktionen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen ohne Vorlage gesammelt.

Wie in der Abb. 12 zu sehen, erscheint das höhermolekulare Protein (radioaktiv markiertes TSH) im 1.Peak, welcher gepoolt wird. Das freie Jodid wurde später im 2.Peak eluiert.

Um radioaktiv markiertes membran-bindendes von nicht bindendem TSH abzutrennen, wurde eine Reinigung des bov. TSH--Tracers über Schilddrüsenmembranen durchgeführt. Dazu wurden bovine Schilddrüsenmembrane, welche in gleicher Weise wie humane Schilddrüsenmembrane präpariert wurden (s. 2.2.7.1.2.), verwendet.

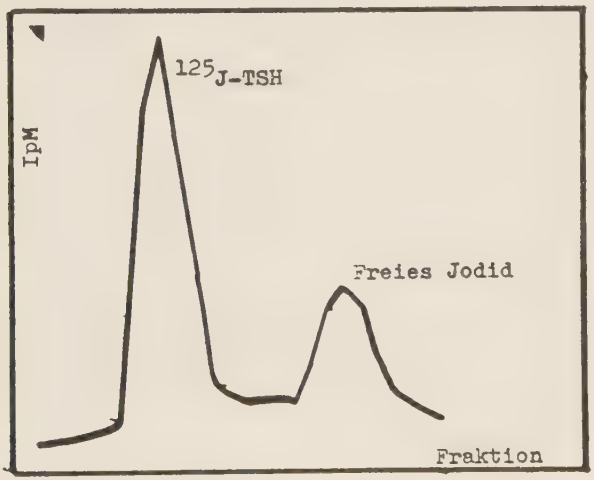

Abb. 12: ^{125}J-TSH - Reinigung mit Sephadex G 75. Peak I enthält das markierte TSH, Peak II das freie Jodid. Eine weitere Auftrennung des Proteinpeaks wird auf einer Sephadex G 100-Säule durchgeführt (s. Abb. 13).

Der gepoolte TSH-Peak (s. Abb. 12), wovon 20 µl zur Bestimmung der Ausbeute und der spezifischen Aktivität entnommen und gezählt wurden, und 1 ml bovine Schilddrüsenmembrane (entspricht 5 g SD-Äquivalent/1 ml) wurden 30 Minuten bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurde 10 Minuten bei 17 500 g (Beckman, Ti 50, 4° C) zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde wieder eine Probe von 20 µl entnommen und gezählt.

Das Pellet wurde in Tris-HCl-Puffer, 0.02 M, pH 7.4, und 0.5 % BSA (bovines Serumalbumin zur Verhinderung von Adsorption) resuspendiert und mit Tris-HCl-Puffer auf 8 ml aufgefüllt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Anschließend wurde das Pellet in 0.5 ml 2 M NaCl und 0.1 % BSA (H_2O) resuspendiert und mit gleichem Puffer auf 3 ml aufgefüllt und anschließend 30 Minuten bei 4° C geschüttelt. Danach wurde 60 Minuten bei 120 000 g zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde wieder 20 µl gezählt. Der Restüberstand wurde dann über eine Sephadex G 100-Säule (Fa. Pharmacia, Schweden) chromatographiert (s. Abb. 13).

Die Säule wurde vorher mit Tris-HCl-Puffer (0.02 M, pH 7.4) und 0.5 % BSA äquilibriert. Es wurden 1 ml-Fraktionen gesammelt. Sofort nach der Reinigung wurde der TSH-Peak gepoolt und mit Tris-HCl-Puffer (0.02 M, pH 7.4) und 0.5 % BSA auf 6000-7000 cpm/50 µl verdünnt, um in dieser Form als Tracer verwendet zu werden.

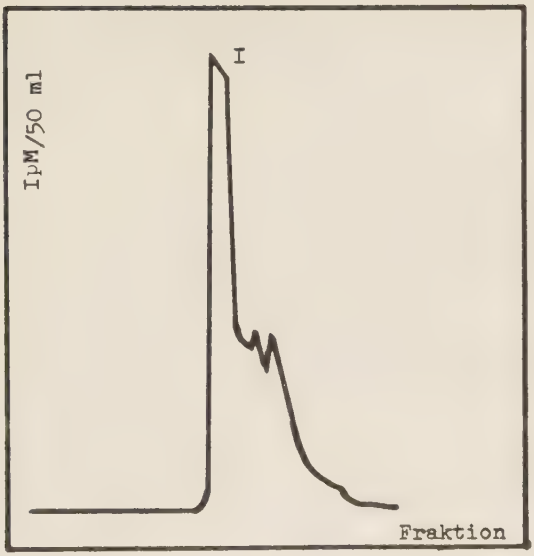

Abb. 13: Auftrennung des TSH-Peaks (s. Abb. 12) auf einer Sephadex G 100-Säule. Fraktion I wird als Tracer im RRA verwendet.

2.2.7.1.4. Standards und Standardkurve

Für die Auswertung eines Radiorezeptorassays benötigt man Standardsubstanzen, die weitgehend mit der zu bestimmenden Substanz in der Patientenprobe identisch sind. Die als Standard verwendete Reinsubstanz soll über längere Zeit stabil sein, keine Verunreinigungen enthalten, die die Testführung beeinflussen und in gleichbleibender Qualität für längere Zeit zur Verfügung stehen.

Um die Qualität von Membranpräparation und Tracer zu überprüfen, wurde nach der Bound/Free-Trennung und Messung der Radioaktivität eine Standardkurve (16) mit Hilfe genau definierter Standards aufgenommen (s. Abb. 14) und die Meßwerte der Patientenproben verglichen.

10 IE bov. TSH (Fa. Bio-Sigma) wurde in 2 ml 0.9 % NaCl und 2 % BSA gelöst (entspricht 5 E/ml) und Verdünnungen (mit 0.9 % NaCl und 2 % BSA) zwischen 0.49 und 125 mE/ml wurden als Standards verwendet.

2.2.7.2. Testansatz und Durchführung

Vor dem Testansatz wurden die humanen Schilddrüsenmembrane mit Tris-HCl-Puffer (0.02 M, pH 7.4) und 0.5 % BSA so verdünnt, daß etwa 20 % spezifische Bindung erreicht wurde.

In der ersten Inkubationsphase reagieren die Membranrezeptoren mit den zu bestimmenden unmarkierten Substanzen in den Patientenproben bzw. Standards. Durch diese sog. "kalte Vorinkubation" wird die Empfindlichkeit des Tests erhöht. Unter dem Begriff "Kalte Vorinkubation" wird ein Testansatz verstanden, bei dem die Aktivität erst wesentlich später

als das unmarkierte Antigen zum Reaktionsansatz hinzugefügt wird und so das unmarkierte Antigen schon vorab mit dem Antikörper reagieren kann. Der bov. TSH-Tracer wird also erst nach einer Stunde hinzugegeben und reagiert so in einer zweiten, sog. "heißen Inkubationsphase", bis ein Gleichgewicht erreicht ist (7).

Testansatz:
50 µl Probe und 100 µl humane Schilddrüsenmembranpräparation wurden zusammenpipettiert und eine Stunde im Wasserbad bei 37° C geschüttelt. Danach wurde 50 µl bov. TSH-Tracer hinzupipettiert und erneut eine Stunde bei 37° C geschüttelt. Anschließend wurde 1.5 ml Tris-HCl-Puffer (0.02 M, pH 7.4, kalt) mit 0.5 % BSA hinzugegeben, 15 Minuten bei 10 000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Radioaktivität gemessen.

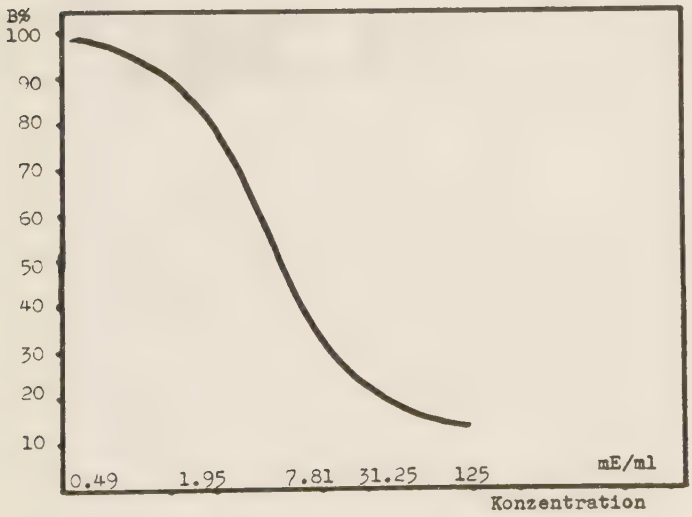

Abb. 14: Standardkurve mit log-lin Auftragung (s. 2.2.7.1.4.).

3. ERGEBNISSE

3.1. Elektrophoresen

Die Celluloseacetat-Elektrophorese (s. 2.2.4.) zeigt die Anreicherung von Immunglobulinen nach PEG-Fällung und endgültig nach der DE 32-Chromatographie, sowie in den Proteinpeaks I bis III und V nach der Affinitätschromatographie über Protein A-Sepharose.

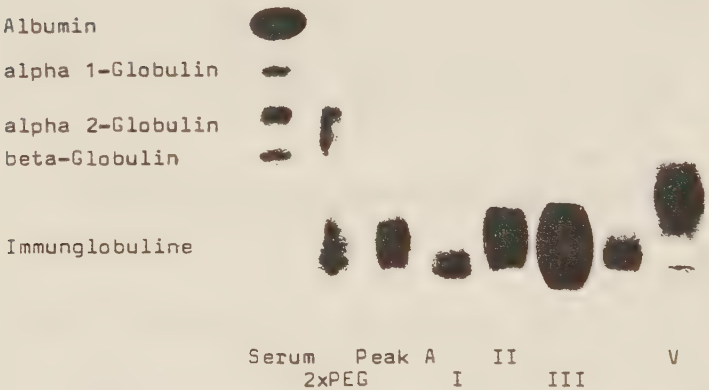

Abb. 15: Celluloseacetat-Elektrophorese
Peak A entspricht Gesamt-IgG (s. Abb. 3).

3.2. Ouchterlony-Tests

Bei vier Patienten wurden Ouchterlony-Tests (s. 2.2.5.) durchgeführt. Die Ergebnisse stimmen untereinander überein und sind in der Tab. 2 dargestellt.

Im Serum waren erwartungsgemäß alle IgG-Subklassen, IgA und IgM nachweisbar. IgA und IgM waren außer im Serum ausschließlich im Peak IV nachweisbar. Peak I enthielt, wie erwartet, nur IgG 3 und im Peak V waren neben IgG 4 auch IgG 1 und 2 nachweisbar.

Tab. 2: Ergebnisse der Ouchterlony-Tests mit spezifischen Kaninchen-Antikörpern gegen humane IgG 1 bis 4, IgM und IgA.

Peak	I	II	III	IV	V	Serum
IgG 1	-	+	+	-	+	+
IgG 2	-	+	+	-	+	+
IgG 3	+	-	-	-	-	+
IgG 4	-	+	+	-	+	+
IgM	-	-	-	+	-	+
IgA	-	-	-	+	-	+

3.3. Nephelometrische IgG-Subklassen-Bestimmung

Mit Hilfe einer nephelometrischen Immunoassay-Methode wurde im Paul-Ehrlich-Institut in Frankfurt a. M. in den Subfraktionen I, II, III und V (s. Abb. 8 und 9) eine IgG-Subklassen--spezifische Proteinbestimmung durchgeführt (s. 2.2.6.2.). Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 dargestellt.

Die höchste prozentuale Anreicherung von IgG 3 erschien in Peak I. Die Trennung von IgG-Subklasse 1 und 2 ist unvollständig, 57 % von IgG 1 befindet sich in Peak III bzw. 44 % von IgG 2 in Peak II.
Die Trennung von IgG-Subklasse 3 bereitete keine besonderen Schwierigkeiten; ca. 87 % der Gesamt-IgG-Menge in Peak I wurde als IgG 3 bestimmt.

Tab. 3: IgG-Subklassen-Bestimmung in den Subfraktionen I-III und V. Diese Proteinbestimmung wurde mit Hilfe eines nephelometrischen Immunoassays durchgeführt.

Peak	IgG 1 mg/dl(%)	IgG 2 mg/dl(%)	IgG 3 mg/dl(%)	IgG 4 mg/dl(%)	Gesamt-IgG mg/dl(100 %)
I	2.4(5.4)	1.7(3.8)	38.6(87.1)	1.4(3.1)	44.3
II	58.5(29.7)	86.7(44.0)	41.4(21.0)	10.0(5.0)	197.0
III	420.0(56.9)	202.9(27.5)	67.2(9.1)	45.7(6.2)	738.0
V	(66.0)	(28.0)	(2.5)	(3.8)	

3.4. TDA-Bestimmung

Die Ergebnisse der TDA-Bestimmung in den Peaks I-V durch Radiorezeptorassay sind in der Tabelle 4 dargestellt.

Kontroll-IgG stammt von einem Patienten mit Autonomem Adenom der Schilddrüse.

Patient Nr. 1, dessen TDA im Gesamt-IgG (entspricht Peak A in der Abb. 3) 28.2 % betrug, hatte in allen vier Subfraktionen (I, II, III und V) positive Werte. Patient Nr. 2, 3 und 8 hatten nur in zwei Subfraktionen positive TDA-Werte. Bei den Patienten Nr. 6-9 war TDA im Gesamt-IgG primär grenzwertig oder negativ, nach der Auftrennung jedoch konnte in Peak I, III und V bei Patient Nr. 6 und 7, in Peak I und III bei Patient Nr. 8 und in Peak I bei Patient Nr. 9 TDA nachgewiesen werden.

Bei den meisten Patienten konnten in Peak I, III und V TDA nachgewiesen werden, nicht aber in Peak II. In Peak IV war erwartungsgemäß kein TDA nachzuweisen.

Tab. 4: TDA-Bestimmung
Ergebnisse der Verdrängung des radioaktiv markierten TSH von den TSH-Rezeptoren der Schilddrüsenzellmembranpräparation durch IgG aus Patientenseren.
TSH-Bindung nach Zugabe des Patienten-IgG / TSH-Bindung nach Zugabe von Kontroll-IgG % = TDA
Werte unter 85 % wurden als positiv bezeichnet.

Pat.	Gesamt-IgG (Peak A)	I	II	III	IV	V
1	28.2	31.5	32.6	18.9	112.3	31.0
2	28.2	92.4	81.4	19.0	-	39.2
3	42.3	72.5	98.6	29.4	142.6	94.8
4	42.7	63.9	107.1	36.0	-	47.7
5	60.9	63.7	92.3	52.2	116.1	32.2
6	75.3	49.6	86.9	54.3	-	39.0
7	79.2	76.4	90.3	57.3	-	75.5
8	83.4	59.1	115.9	69.1	-	84.7
9	114.4	49.3	120.0	88.1	107.1	112.1
K	100	103.2	114.6	109.2	125.5	110.5

K (Kontrollserum)

3.5. Bestimmung der mikrosomalen (MAK) und Thyreoglobulinantikörper (TGAK)

Tab. 5: Ergebnisse der mikrosomalen und Thyreoglobulin-antikörper-Bestimmung

Probe (Protein (mg/ml))	MAK (1:)	TGAK (µg/ml)	TDA (%)
Serum (57.9)	409,600	161.0	-
IgG (7.0)	409,600	180.0	71.4
I (7.0)	400	30.9	49.6
II (7.0)	102,400	168.2	86.9
III (7.0)	1,638,400	166.0	54.3
V (7.0)	102,400	109.0	39.0

4. DISKUSSION

Es wird allgemein akzeptiert, daß die immunogene Hyperthyreose vom Typ des Morbus Basedow durch Immunglobuline der Klasse G hervorgerufen wird. Die genaue Charakterisierung dieser Immunglobuline ist bisher nur unvollständig gelungen. Insbesondere ist es unklar, ob es sich um einen mono- oder polyklonalen Antikörper handelt. Um diesen Fragen nachzugehen, haben wir Seren von Morbus Basedow-Patienten näher untersucht.

Das humane IgG wird, wie Untersuchungen von Hjelm und Mitarbeiter (9) gezeigt haben, bei neutralem pH an Protein A--Sepharose gebunden, jedoch mit Ausnahme von Subklasse 3, die nicht gebunden wird (14, 10) und daher bei der Affinitätschromatographie über Protein A-Sepharose zum größten Teil im Ausschlußvolumen (Peak I, s. Abb. 8) erscheint (10). Ein kleiner Rest von IgG 3 wird jedoch an die Säule gebunden und später bei niedrigeren pH-Werten eluiert (28). Im Gegensatz zu IgG 3 bereitet vor allem die Trennung von IgG 1 und 2, die bei der Chromatographie als zwei sich überlappende Peaks (s. Abb. 8) erscheinen, noch einige Schwierigkeiten. Die Verteilung der IgG-Subklassen in den beiden sich überlappenden Peaks wurde im Detail durch Untersuchungen von Duhamel und Mitarbeitern (5) gezeigt.

Die IgG-Subklassen 1 bis 4 nach Affinitätschromatographie über Protein A-Sepharose wurden qualitativ durch die Immundiffusion nach Ouchterlony und quantitativ durch einen nephelometrischen Immunoassay bestimmt.

Das Ergebnis zeigt, wie erwartet, daß die höchste prozentuale Anreicherung von IgG 3 (über 87 %) im ersten Peak erscheint. Peak II enthält vornehmlich IgG 2 (44 %) neben beachtlichen

Mengen der übrigen Subklassen (29 % IgG 1, 21 % IgG 3), Peak III in erster Linie IgG 1 (57 %).

Der qualitative und quantitative Nachweis stimmen im wesentlichen überein und bestätigen die Schwierigkeit der Trennung von IgG 1 und 2.

IgA und IgM waren ausschließlich in der an DE 32-Cellulose gebundenen Fraktion (Peak B, s. Abb. 3) nachweisbar (s. Tab. 2).

Nach einer Arbeit von Skvaril und Morell (29) wurde IgG 4 bei der Anionenaustausch-Chromatographie im Gegensatz zu uns nur in Peak B (s. Abb. 3), jedoch nicht in Peak A gefunden.

In der Hoffnung, IgG 4 anzureichern und um IgA und IgM zu erfassen, haben wir auch den zweiten Proteinpeak nach der DE 32-Cellulose-Chromatographie (Peak B in der Abb. 3) über Protein A-Sepharose aufgetrennt:
Peak IV und V.

Peak IV bestand hauptsächlich aus IgA, IgM, alpha 2- und beta-Globulinen und Albuminresten.

Eine Anreicherung von IgG 4 in Peak V, der wegen zu geringer Proteinausbeute gepoolt wurde, gelang nicht. Es handelte sich vornehmlich um IgG 1 (s. Tab. 3).

TDA wurde durch den Radiorezeptorassay mit ungereinigten menschlichen Schilddrüsenplasmamembranen ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

TDA war vor allem in Peak III (entspricht IgG 1) nachweisbar und nur in einem Fall in Peak II (Pat. Nr. 1). In zwei Fällen (Pat. Nr. 3 und 9) war das TDA in jeweils nur einer Proteinfraktion positiv. Bei allen Patienten erfolgte eine

teilweise erhebliche Anreicherung von TDA in einer der Fraktionen im Vergleich zum Gesamt-IgG.

Bei vier Patienten (Nr. 6 bis 9) mit grenzwertigem bzw. negativem TDA im Gesamt-IgG war das TDA nach der Auftrennung deutlich positiv.

Im Gegensatz zu Ochi und Mitarbeitern (21) konnten wir in Peak I, der hauptsächlich IgG 3 enthielt, bei 8 von 9 untersuchten Patienten mit Morbus Basedow TDA nachweisen (s. Tab. 4).

In Peak IV, der, wie erwähnt, neben den anderen Verunreinigungen IgA und IgM enthielt, war kein TDA nachweisbar. Peak V enthielt in der Mehrzahl der Fälle TDA, was auf den hohen Anteil an IgG 1 zurückzuführen sein dürfte.

Bei der Bestimmung der mikrosomalen und Thyreoglobulinantikörper im Ausgangsmaterial und nach der Fraktionierung zeigte sich keine Koinzidenz von Schilddrüsenautoantikörpern und TDA (s. Tab. 5).

Aus diesen Ergebnissen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Trotz eingeschränkter Aussage wegen ungenügender Auftrennung kann man spekulieren, daß es sich beim TDA um einen Antikörper mit eingeschränkter Heterogenität handelt. Es könnte sich also um einen individuell oligoklonalen Antikörper handeln.

Nach der Auftrennung in die IgG-Subklassen und damit verbundenen Anreicherung kann das TDA auch bei primär TDA-negativen Patienten nachgewiesen werden.

IgA und IgM haben nach unseren Untersuchungen keinen Anteil am TDA.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Untersuchung von TDA bei Basedow-Patienten wurde IgG mit 25 %-igem Polyäthylenglykol aus dem Serum gefällt und anschließend mit dem Anionenaustausch-Gel DE 32-Cellulose chromatographiert. Zunächst wurde mit niedermolekularem Puffer der nicht gebundene Proteinanteil (Peak A) eluiert, danach mit hochmolekularem Puffer das Restprotein (Peak B) gewonnen. Die so erhaltenen Fraktionen wurden dann über an Sepharose gebundenes Protein A mittels eines pH-Gradienten weiter aufgetrennt:
Peak A in Peak I, II und III; Peak B in Peak IV und V, der wegen zu geringer Proteinausbeute gepoolt wurde.
Die quantitative und qualitative Bestimmung der Subklassen nach Affinitätschromatographie über Protein A-Sepharose zeigt, daß IgG 3 erwartungsgemäß nicht gebunden wird und im Peak I erscheint. Peak II enthält vornehmlich IgG 2 neben beachtlichen Mengen der übrigen Subklassen, Peak III in erster Linie IgG 1. Quantitativer und qualitativer Nachweis stimmen im wesentlichen überein. Eine Anreicherung von IgG 4 in Peak V gelang nicht, was auch durch die quantitative Bestimmung bestätigt wurde, es handelt sich vornehmlich um IgG 1. IgA und IgM waren ausschließlich im Peak IV nachweisbar.
TDA wurde durch den Radiorezeptorassay mit ungereinigten menschlichen Schilddrüsenplasmamembranen ermittelt, wobei das Ergebnis als Quotient der TSH-Bindung in Anwesenheit von Patienten-IgG zu TSH-Bindung in Anwesenheit von Kontroll-IgG in Prozent angegeben wird. Werte unter 85 % sind positiv. Als Kontrolle diente ein Patient mit einem Autonomen Adenom der Schilddrüse, dessen Gesamt-IgG und sämtliche Fraktionen TDA-negativ waren.
TDA war vor allem in Peak III nachweisbar und nur in einem Fall in Peak II. In zwei Fällen war das TDA in jeweils nur einer Proteinfraktion positiv. Bei allen Patienten erfolgte eine teilweise erhebliche Anreicherung von TDA in einer der Fraktionen im Vergleich zum Gesamt-IgG. Bei vier Patienten mit grenzwertigem oder negativem TDA im Gesamt-IgG war das TDA nach der Auftrennung deutlich positiv. Im Peak IV war kein TDA nachweisbar. Peak V enthielt

in der Mehrzahl der Fälle TDA, was auf den hohen Anteil an IgG 1 zurückzuführen sein dürfte.
Bei der Bestimmung der mikrosomalen und Thyreoglobulinantikörper im Ausgangsmaterial und nach der Fraktionierung zeigte sich keine Koinzidenz von Schilddrüsenautoantikörpern und TDA.

Schlußfolgerungen:

- Es könnte sich beim TDA um einen individuell oligoklonalen Antikörper handeln, wobei eine endgültige Aussage aufgrund der unzureichenden Auftrennung nicht möglich ist.
- Nach Auftrennung in die IgG-Subklassen und damit verbundenen Anreicherung kann das TDA auch bei primär TDA-negativen Patienten nachgewiesen werden.
- IgA und IgM haben keinen Anteil am TDA.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADAMS, D.D., H.D. PURVES:
Abnormal responses in the assay of thyrotrophin.
Proc. Univ. Otago Med. School 34 : 11, 1956

2. ANDERSON, P.H., K. FUKUSHIMA, H.S. SCHILLER:
Radioimmunoassay of Plasma Testosterone with Use of Polyethylene Glycol to Separate Antibody-Bound and Free Hormone.
Clin. Chem. 21 : 708, 1975

3. BECK, O.E., P.E. KAISER:
Nephelometry of Human IgG Subclass Concentration in Serum.
Clin. Chem. 27/2 : 310, 1981

4. DIEM, K.:
Documenta Geigy
Wissensch. Tabellen, 6. Aufl., J.R. Geigy, Basel, 1960

5. DUHAMEL, R.C., P.H. SCHUR, K. BRENDEL, E. MEEZAN:
pH Gradient elution of human IgG 1, IgG 2 and IgG 4 from Protein A-Sepharose.
J. Immun. 31 : 211, 1979

6. GREENWOOD, F.C., W.M. HUNTER, J.S. GLOVER:
The preparation of ^{131}J-labeled human growth hormone of high specific radioactivity.
Biochem. 89 : 114, 1963

7. HABERMANN, J., C.R. PICKARDT, P.C. SCRIBA:
Interaction of TSH and "TSJ" with thyroid membranes.
Acta endocr. (Kbh) 234 : 26, 1980

8. HENNEMANN, G., A. DOLMAN, R. DOCTER, A. de REUS, J. v. ZIJL:
Dissociation of serum LATS activity and hyperfunction and autonomy of the thyroid gland in Grave's disease.
J. clin. Endocr. 40 : 935, 1975

9. HJELM, H., K. HJELM, J. SJÖQUIST:
Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins.
FEBS Lett. 28 : 73, 1972

10. HJELM, H.:
Isolation of IgG 3 from normal human sera and from a patient with multiple myelomatosis by using protein A-Sepharose 4B.
Scand. J. Immunol. 4 : 633, 1975

11. HJELM, H., J. SJÖDAHL, J. SJÖQUIST:
Immunologically active and structurally similar fragments of protein A from Staphylococcus aureus.
Eur. J. Biochem. 57 : 395, 1975

12. HUNTER, W.M., F.C. GREENWOOD:
Preparation of Iodine-131 Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity.
Nature 194 : 495, 1962

13. KRISS, J.P., V. PLESHAKOV, J. R. CHIEN:
Isolation and identification of the long acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxoedema.
J. Clin. Endorc. 24 : 1005, 1964

14. KRONVALL, G., R.C. WILLIAMS:
Differences in anti-protein A activity among IgG-subgroups.
J. Immunol. 103 : 828, 1969

15. LIPMAN, I.M., D.E. GREEN, N.J. SYNDER, J.C. NELSON, D.H. SOLOMON:
Relationship of long acting thyroid stimulator to the clinical feature and course of Grave`s disease.
Amer. J. Med. 43 : 486, 1967

16. MARSCHNER, I., F. ERHARDT, P.C. SCRIBA:
Calculation of the radioimmunoassay standard curve by "spline function".
Int. Atom. Energ. Ag. 1 : 111, 1974

17. MATSUI, Y., G.N. BEALL, I.J. CHOPRA, D.H. SOLOMON, S. KRÜGER, M. BEALL:
Assays for antigen-stimulated lymphocyte-derived migration enhancement and inhibition factors from patients with thyroid diseases and their relatives.
Acta endocr. (Kbh.) 86 : 733, 1977

18. McILVAINE, T.C.:
A buffer solution for colorimetric comparison.
J. Biol. Chem. 49 : 183, 1921

19. MEHDI, S.Q., J.P. KRISS:
Preparation of Radiolabeled Thyroid-Stimulating Immunoglobulins (TSI) by Recombining TSI Heavy Chains with ^{125}J-Labeled Light Chains: Direct Evidence That the Product Binds to the Membrane Thyrotropin Receptor and Stimulates Adenylate Cyclase.
Endocr. 103 : 296, 1978

20. MOVITZ, J.:
A study on the biosynthesis of protein A in Staphylococcus aureus.
Eur. J. Biochem. 48 : 131, 1974

21. OCHI, Y., T. HACHIYA, M. YOSHIMURA, T. MIYAZAKI:
Distribution of LATS activity in Immunoglobulin G subclass.
Acta endocr. 85 : 791, 1977

22. PETERSEN, V.B., P.J.D. DAWES, B. REES SMITH, R. HALL:
The interaction of thyroid-stimulating antibodies with solubilized human thyrotrophin receptors.
FEBS Lett. 83 : 63, 1977

23. PHARMACIA FINE CHEMICALS:
Protein A, Protein A-Sepharose CL-4B

24. SCHLEUSENER, H., P. KOTULLA, F. ADLKOFER, R. FINKE:
Wirkungsmechanismus und Bedeutung von schilddrüsenstimulierenden Antikörpern (thyroid stimulating immunoglobulins/TSI) bei der Entstehung der Hyperthyreose vom Typ Basedow.
In Herrmann, J., H.L. Krüskemper, B. Weinheimer (Hersg.): Schilddrüse 1975, S. 120.
Thieme, Stuttgart 1977

25. SCHLEUSENER, H., P. KOTULLA, R. FINKE, H. SÖRJE, H. MEINHOLD, F. ADLKOFER, K. W. WENZEL:
Relationship between Thyroid Status and Graves` disease specific immunoglobulins.
J. clin. Endocr. Metab. 47 : 379, 1978

26. SCHLEUSENER, H., R. FINKE, P. KOTULLA, K.W. WENZEL, H. MEINHOLD, H. D. ROEDLER:
Determination of thyroid stimulating immunoglobulins (TSI) during the course of Grave's disease. A reliable indicator for remission and persistence of this disease?
J. Endocrinol. Invest. 2 : 155, 1978

27. SJÖQUIST, J., B. MELOUN, H. HJELM:
Protein A isolated from Staphylococcus aureus after digestion with lysostaphin.
Eur. J. Biochem. 29 : 572, 1972

28. SKVARIL, F.:
The Question of specificity in binding human IgG subclasses to Protein A-Sepharose.
Immunochemistry 13 : 871, 1976

29. SKVARIL, F., A. MORELL:
The G_4 subclass in IgG Fractions Prepared by Ion-Exchange Chromatography.
J. Immunol. 104 : 1310, 1970

30. VERWEY, E. F.:
A type-specific protein derived from the staphylococcus.
J. Exp. Med. 71 : 635, 1940

31. VOLPÈ, R.:
The Role of Autoimmunity in Hypoendocrine and Hyperendocrine Function. With Special Emphasis on Autoimmune Thyroid Disease.
Ann. intern. Med. 87 : 86, 1977

32. WALL, J. R., S. L. FANG, S. H. INGBAR, L. E. BRAVERMAN:
Lymphocyte Transformation in Response to Human Thyroid Extract in Patients with Subacute Thyroiditis.
J. clin. Endocr. 43 : 587, 1976

33. WOOD, W. G., I. MARSCHNER, P. C. SCRIBA:
Tests on Three Antisera and Subsequent Development of Radioimmunoassay for Different Regions of Human Parathyrin.
Horm. Met. Res. 11 : 309, 1979

Lebenslauf

Am 15.7.1952 wurde ich als Sohn des Lehrers Mehmet Akyol und seiner Ehefrau Zeliha, geb. Yiğit, in Üzümlü/Türkei geboren.

Von 1959 bis 1965 besuchte ich Volksschulen in Tokat und Antakya in der Türkei, zuletzt ein Jahr in München. Anschließend trat ich in das Pestalozzi-Gymnasium in München ein, wo ich im Juni 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1973 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde an der Universität des Saarlandes. Im Oktober 1974 legte ich in Saarbrücken die naturwissenschaftliche, im April 1976 in Homburg/Saar die zahnärztliche Vorprüfung ab.

Ab Sommersemester 1977 setzte ich mein Studium an der Universität in Köln fort, wo ich im Dezember 1978 die zahnärztliche Prüfung ablegte.

Von 1979 bis 1981 war ich in Zahnarztpraxen in Nordrhein-Westfalen als Assistent tätig.

Von Juli bis November 1981 arbeitete ich am experimentellen Teil der vorliegenden Promotionsarbeit.